

rate and optical density of lactobacilli in a batch culture were estimated. The experiment was performed using the BioSan RTS-1 personal bioreactor with software and the function of monitoring the growth of microorganisms in real time. Natural carriers are modified prior to immobilization by mechanical and heat treatment methods. High molecular weight polyvinylpyrrolidone mixed with distilled water at a temperature of not more than 0.13 g/ml. Then the solution was passed through an electrospiner to obtain nanofibers. The diameter of the fibers was 200–300 nm.

Fermentation of enzymes is associated with the fact that cells immobilized on carriers retain proliferative function. In the experiments and in the control, there are excellent kinetic characteristics of cell growth, which proves the possibility of using the studied carriers to increase the biomass of the producer strain. All this has a different effect for the studied microorganism - from desynchronization of growth to a significant increase in growth rate and optical density.

This work was financially supported by the Innovation Promotion Fund and the RBC investment company.

УДК 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-40-41

УПРАВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФЕНИЛАЦЕТОНМОНООКСИГЕНАЗЫ, ИММОБИЛИЗОВАННОЙ НА ГИБРИДНЫХ НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТ-ЗОЛОТ, ПОД ДЕЙСТВИЕМ НИЗКОЧАСТОТНОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Веселов М.М., Головин Ю.И., Секундо Ф., Клячко Н.Л.

Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, кафедра химической энзимологии

Тамбовский государственный университет им.Г.Р. Державина, Тамбов, Россия

Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare

Москва, 119991, Ленинские Горы д. 1, стр. 116, Россия, e-mail: veselov.mac@gmail.com

Фенилацетонмонооксигеназа (РАМО) была иммобилизована через полигистидин на Ni-NTA гибридных наночастицах магнетит-золото. В результате иммобилизации фермент практически полностью теряет свою каталитическую активность. Под действием магнитного поля частотой 50 Гц и напряженностью 100 мТл наблюдается увеличение скорости катализируемой ферментом реакции в 1,5 раза в результате «отрыва» РАМО от матрицы.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, низкочастотное магнитное поле, биокатализ, фенилацетонмонооксигеназа (РАМО), иммобилизация ферментов

Фенилацетонмонооксигеназа (РАМО) – фермент из семейства Байера-Вилигера, который катализирует превращение фенилацетона в фенилацетат под действием молекулярного кислорода и NADPH в качестве кофермента. Он состоит из двух доменов – FAD-связывающего и NADPH-связывающего, разделенных крайне консервативным линкером, состоящим из 11 аминокислот (остатки 167-177), называемым «отпечатками пальцев». Ранее было показано [1], что остаток His-173 очень важен для катализа и связывания FAD. Этот остаток полностью экспонирован в растворитель и, по всей видимости, играет важную роль, участвуя во вращении доменов и конформационных изменениях, происходящих в ходе катализа вместе с другими остатками консервативного линкера.

Для эксперимента мы синтезировали гибридные наночастицы магнетит-золото (M-GNP) согласно [2]. Поверхность золота была затем функционализирована нитрилтриуксусной кислотой (NTA), которая образовывала комплекс ионами Ni²⁺. РАМО была иммобилизована на этой матрице (Ni-NTA модифицированные наночастицы) с помощью полигистидиновой (6-His) последовательности. На всех этапах синтеза наночастиц, функционализации их поверхности и иммобилизации фермента был проведен анализ методами просвечивающей электронной микроскопии, динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц.

На последнем этапе нашей работы мы изучили влияние низкочастотного переменного магнитного поля (НЧПМП) частотой 50 Гц и интенсивностью 100 мТл на каталитическую активность иммобилизованной РАМО. В результате иммобилизации активность РАМО снижалась практически до нуля. Ранее было предположено [1], что такое явление обусловлено связыванием остатка His-173 с Ni-NTA модифицированными носителями. Под действием магнитного поля в первые два часа мы не наблюдали ферментативной активности совсем, однако после этого реакция ускорялась. Константа скорости реакции, вычисленная по

полным кинетическим кривым с учетом седиментации наночастиц, возрастала в 1,5 раза по сравнению с константой реакции без действия магнитного поля. Мы предполагаем, что под действием гидродинамических сил, возникающих в результате механического вращения наночастиц под действием НЧПМП, происходит частичная десорбция остатка His-173, то есть отрыв (полный или частичный) фермента от матрицы, что переводит фермент в активное состояние.

Эта работа частично поддержана грантами РФФИ 17-54-33027 и 18-29-09154, темой Гос. Регистрации АААА-А16-116052010081-5, Программой развития МГУ

Литература

1. Malito et. all. *Crystal structure of a Baeyer–Villiger monooxygenase*. PNAS, 2004, vol. 101. 36, pp 13157-13162
2. M. Efremova et. all. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, p. 11295

UDC 577.15 DOI 10.37747/2312-640X-2020-18-40-41

IMMOBILIZED ONTO HYBRID MAGNETITE-GOLD NANOPARTICLES PHENYLACETONEMONOOXYGENASE AND ITS REGULATION UNDER LOW-FREQUENCY MAGNETIC FIELD

Veselov M.M., Golovin Yu.I., Secundo F., Klyachko N.L.

Department of Chemical Enzymology, School of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
G.R. Derzhavin Tambov State University, Tambov, Russia
Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare
119991 Moscow, Leninskiye Gory 1-11b, e-mail: veselov.mac@gmail.com

PAMO was immobilized onto Ni-NTA modified hybrid magnetite-gold nanoparticles through polyhistidine motif. As a result of immobilization, enzyme has become fully inactive. Under the exposure to 50 Hz 100 mT magnetic field, catalyzed by enzyme reaction rate increases 1.5 times due to PAMO desorption from nanoparticles.

Key words: magnetic nanoparticles, low-frequency magnetic field, biocatalysis, enzyme immobilization

Phenylacetone monooxygenase (PAMO) is an enzyme of Baeyer-Villiger family that catalyzes the conversion of phenylacetone to phenylacetate using molecular oxygen and NADPH. It consists of FAD-binding and NADP-binding domains divided by very conserved motif of 11 amino acids called fingerprints (residues 167-177). It was shown [1] that His-173 is very crucial for catalysis and FAD binding. This residue is fully solvent exposed and together with fingerprint motif residues are likely to have a critical role by taking part in the domain rotations and conformational changes that occur during the catalytic cycle.

For experiment, hybrid magnetite-gold nanoparticles (M-GNP) were synthesized according to [2]. Then, gold surface of M-GNP were modified with nitrilotriacetic acid (NTA), which formed complex with Ni²⁺ after that. PAMO was immobilized through polyhistidine (6xHis) sequence binding onto Ni-NTA surface M-GNP. All steps of M-GNP synthesis, surface modification and enzyme immobilization were monitored by NTA method, DLS and TEM micro photos.

On the last step of our work, we studied impact of low-frequency (50 Hz 100 mT) on the catalytic activity of immobilized PAMO. As a result of PAMO immobilization its activity decreases practically to zero. It was supposed previously [1] that this phenomenon is associated with His-173 binding to Ni-NTA modified support. Under the exposure to 50 Hz 100 mT magnetic field, it was observed that immobilized enzyme has become fully inactive. However, after magnetic field action the reaction rate was increasing. Reaction rate constant, calculated from full kinetic curves (considering also nanoparticles sedimentation) increases in 1.5 times compared with the constant without LFMF. We supposed, that under the impact of hydrodynamic forces, generated by mechanically rotating nanoparticles in LFMF, desorption of His-173 residue occurs, that led to the enzyme in its active state.

This work was supported by RFBR grants 17-54-33027 and 18-29-09154, State Topic АААА-А16-116052010081-5, MSU Program of Development

References

1. Malito et. all. *Crystal structure of a Baeyer–Villiger monooxygenase*. PNAS, 2004, vol. 101. 36, pp 13157-13162
2. M. Efremova et. all. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8 p. 11295